

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620101152363

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

塔玛亚历山大藻“游动孢子”释放机制的
初步研究

Preliminary study on “the zoospores” releasing
mechanism of *Alexandrium tamarense*

张 艳 梅

指导教师姓名: 彭兴跃教授

专 业 名 称 : 水生生物学

论文提交日期: 2013 年 07 月

论文答辩时间: 2013 年 09 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略字表.....	V
第一章 引言	1
1.1 微流控芯片的研究进展.....	1
1.1.1 微流控芯片的简介.....	1
1.1.2 微流控芯片的应用前景.....	1
1.1.3 微流控芯片的发展前景.....	4
1.2 赤潮藻的危害，产生原因及防治.....	4
1.2.1 赤潮的危害.....	4
1.2.2 赤潮产生的原因.....	4
1.2.3 赤潮的防治.....	5
1.3 有害甲藻生活史的研究进展.....	6
1.4 有害微藻体内寄生生物的研究进展.....	9
1.4.1 病毒.....	10
1.4.2 溶藻细菌.....	10
1.4.3 寄生真菌.....	11
1.4.4 寄生原生动物.....	11
1.4.5 总结与发展趋势.....	12
1.5 分子生物学手段在微藻鉴定方面的应用.....	13
1.5.1 微藻鉴定概况.....	13
1.5.2 18s rDNA 序列扩增在真核生物鉴定方面的应用.....	15
1.5.3 ITS 序列扩增对真核生物生物鉴定方面的应用.....	15
1.6 本论文研究的背景，内容及其意义.....	16
第二章 材料和方法.....	18

2.1 实验材料、试剂和仪器	18
2.1.1 实验材料	18
2.1.2 实验试剂	18
2.1.3 本论文所用引物	18
2.1.4 实验仪器	19
2.2 实验方法	20
2.2.1 主要溶液的配制	20
2.2.2 微流控芯片的制作	21
2.2.3 释放“游动孢子”的塔玛亚历山大藻孢囊的观察	24
2.2.4 “游动孢子”扫描电镜样品处理方法	24
2.2.5 改进后的“游动孢子”扫描电镜样品处理方法	25
2.2.6 塔玛亚历山大藻除菌实验 ^[136]	25
2.2.7 塔玛亚历山大藻无菌藻和带菌藻生活状态的研究	25
2.2.8 塔玛亚历山大藻除菌藻和带菌藻的基因组 DNA 的提取	26
2.2.9 塔玛亚历山大藻除菌结果的检测	26
2.2.10 “游动孢子”基因组 DNA 的提取	27
2.2.11 游动孢子基因组 DNA 的 SSU-rDNA 序列扩增	27
2.2.12 PCR 产物纯化方法	27
2.2.13 质粒构建	28
2.2.14 重组 DNA 转化大肠杆菌	28
2.2.15 克隆	28
第三章 实验结果	29
3.1 微流控芯片实验结果	29
3.1.1 光学显微镜下细胞形态的观察	29
3.1.2 光学显微镜观察厚壁孢囊释放“游动孢子”	30
3.1.3 “游动孢子”群聚现象的光学显微镜观察	31
3.1.4 微流控芯片上塔玛亚历山大藻的培养、富集和“游动孢子”的分离	32
3.1.5 芯片上观察“游动孢子”的二分裂	33
3.2 “游动孢子”扫描电镜图片	34

3.3 释放“游动孢子”的塔玛亚历山大藻孢囊的观察	36
3.4 单个厚壁孢囊释放“游动孢子”数量统计	39
3.5 不同培养基浓度下塔玛亚历山大藻和“游动孢子”数量统计	40
3.6 塔玛亚历山大藻除菌结果	42
3.6.1 光学显微镜下检验结果	42
3.6.2 平板检验	43
3.6.3 电泳检测结果	43
3.7 塔玛亚历山大藻带菌藻和除菌藻生长状态的观察	45
3.8 “游动孢子”分子生物学鉴定结果	46
3.8.1 18S rDNA 扩增结果	46
3.8.2 菌落 PCR 结果	47
3.8.3 测序结果	47
3.8.4 “游动孢子”的系统进化树	50
第四章 讨论	55
4.1 微流控芯片的制作	55
4.1.1 本实验用微流控芯片的设计思路	55
4.1.2 微流控芯片的制作	55
4.1.3 微流控芯片的键合	56
4.2 塔玛亚历山大藻释放“游动孢子”的研究	57
4.3 孢囊爆发孢子条件的研究	59
4.4 “游动孢子”的鉴定	59
4.4.1 扫描电镜处理样品进行形态观察	59
4.4.2 系统发育学研究	62
4.5 塔玛亚历山大藻和“游动孢子”的关系	64
4.6 细菌和“游动孢子”的存在对塔玛亚历山大藻生长状态的影响及其意义	64
第五章 小结与展望	67
5.1 主要研究成果	67
5.2 实验中未解决的问题以及展望	68

参考文献.....	69
-----------	----

致谢.....	78
---------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Chinese Abstract.....	I
English Abstract	III
Abbreviations.....	V
Chapter 1: Introduction.....	1
1.1 Advances in microfluidic chip research	1
1.1.1 Brief introduction of microfluidic chip.....	1
1.1.2 Application of microfluidic chip.....	1
1.1.3 Development prospect of microfluidic chip	4
1.2 Introduction of red tide	4
1.2.1 The damage of red tide	4
1.2.2 The causes of red tide	4
1.2.3 The prevention and cure of red tide	5
1.3 Research progress in life cycle of harmful dinoflagellates	6
1.4 Research progress in parasitism of microalgae.....	9
1.4.1 Viruses.....	10
1.4.2 Algicidal Bacteria	10
1.4.3 Parasitic Fungi	11
1.4.4 Parasitic Protists.....	11
1.4.5 Conclusions and Future Perspectives	12
1.5 Application of molecular biological methods in microalgae identification	13
1.5.1 General introduction of microalgae identification.....	13
1.5.2 Application of 18s rDNA in microalgae identificaton	15
1.5.3 Application of ITS in microalgae identification	15
1.6 Background, content and significance of the study	16
Chapter 2: Materials and methods	18

2.1 Materials, reagents and instruments	18
2.1.1 Materials	18
2.1.2 Reagent	18
2.1.3 Primers in the study	18
2.1.4 Experimental instruments	19
2.2 Experiment methods	20
2.2.1 Preparation of main solutions	20
2.2.2 Fabrication of microfluidic chip	21
2.2.3 Observation of <i>A.tamarensis</i> thick-walled cysts discharging zoospores	24
2.2.4 SEM treatment method for zoospores	24
2.2.5 Improved SEM zoospores treatment method for zoospores	25
2.2.6 Removing bacteria experiment in <i>A.tamarensis</i>	25
2.2.7 Growth condition research of non-axenic and axenic <i>A.tamarensis</i>	25
2.2.8 Genome DNA extraction of non-axenic and axenic <i>A.tamarensis</i>	26
2.2.9 Detecting the effect of <i>A.tamarensis</i> removing bacteria.....	26
2.2.10 Genome DNA extraction of zoospores	27
2.2.11 SSU-rDNA sequence amplification of zoospores genome.....	27
2.2.12 Purification of PCR product	27
2.2.13 Plasmid construction.....	28
2.2.14 Transformation of recombinant DNA.....	28
2.2.15 Clone.....	28
Chapter 3: Experiment results	29
3.1 Results of experiments on microfluidic chips	29
3.1.1 Observation of the cell morphology.....	29
3.1.2 Observation of zoospores thick-walled cyst releasing	30
3.1.3 Observation of the zoospores aggregation phenomenon.....	31
3.1.4 Culturing and enrichment of <i>A.tamarensis</i> and separation of zoospores on microfluidic chip.....	32
3.1.5 Observation of zoospores binary fission on microfluidic chip.....	33

3.2 SEM photographs of zoospores	34
3.3 Observation of <i>A.tamarensis</i> thick-walled cysts releasing zoospores	36
3.4 Quantity statistics of zoospores released by single thick-walled cyst	39
3.5 Quantity statistics of <i>A.tamarensis</i> and zoospores in different medium concentration.....	40
3.6 Removing bacteria results.....	42
3.6.1 Observation result under light microscope	42
3.6.2 Detection using spread plate	43
3.6.3 Result of detection using PCR amplification method	43
3.7 Growth condition research of non-axenic and axenic <i>A.tamarensis</i>	45
3.8 Identification results using molecular biological method.....	46
3.8.1 The result of 18s rDNA sequence amplification.....	46
3.8.2 The result of colony PCR.....	47
3.8.3 Sequencing results	47
3.8.4 Phylogenetic tree of zoospores	50
Chapter 4: Discussion	55
4.1 The production of microfluidic chip.....	55
4.1.1 The design of microfluidic chip used in this study	55
4.1.2 Fabrication of microfluidic chip	55
4.1.3 The bonding of microfluidic chip	56
4.2 Study about <i>A.tamarensis</i> releasing zoospores	57
4.3 Study about conditions of thick-walled cyst releasing zoospores	59
4.4 Identification of paratuberculosis.....	59
4.4.1 Morphologic observation of zoospores under SEM	59
4.4.2 Analysis of phylogenetic tree.....	62
4.5 The relationship about <i>A.tamarensis</i> and “zoospores”	64
4.6 The bacterium and zoospores for growth state of <i>A.tamarensis</i> and the significance of the phenomenon.....	64
Chapter 5: Conclusion and prospect	67
5.1 Main research achievements	67

5.2 Unsolved problems and prospect of the study.....	68
References	69
Acknowledgement.....	78

厦门大学博硕士论文摘要库

中文摘要

赤潮作为一种世界性的危害，其爆发时对于海洋环境、水产养殖乃至人类健康都会造成巨大损害，因此赤潮的起源和防治多年来一直是众多专家学者研究的热点。上个世纪九十年代提出的微全分析系统，具有微型化、集成化和便携化等优势。因此可以利用微流控芯片来模拟赤潮藻的自然生长环境，对群体及单个细胞进行精确的捕捉和控制，这也将为研究赤潮爆发的机制以及控制赤潮爆发提供一个新的技术形式。

本研究结合微流控芯片技术对塔玛亚历山大藻释放类似游动孢子的生物体（以下简称“游动孢子”）现象进行了初步的研究。在微流控芯片上进行连续培养，研究了塔玛亚历山大藻的生活史以及游动生物体的产生、释放、相互作用和生长等动态过程；对塔玛亚历山大藻细胞释放出的游动生物体进行形态和分子生物学鉴定；构建系统发育树了解游动生物体的进化过程对其进行初步分类；对此游动生物体存在的生态学意义进行研究。

正如 Denn 等^[1]、Garcés 等^[2]和 Leander 等^[3]在其文章中所讲，文中所提到的“游动孢子”并非实际意义上塔玛亚历山大藻生活史中的游动孢子，而是对上述塔玛亚历山大藻所释放出来的微小近球形的游动生物体的更加形象的说法。本文结果如下：

（1）制作微流控芯片用于塔玛亚历山大藻的培养和“游动孢子”的富集。在微流控芯片上对塔玛亚历山大藻细胞进行连续记录，观察到塔玛亚历山大藻细胞的厚壁孢囊释放“游动孢子”的现象，每个厚壁孢囊对于“游动孢子”的释放量不等，最高可达 50 个；同时在微流控芯片上记录了“游动孢子”的二分裂过程。

（2）塔玛亚历山大藻起始密度越低，厚壁孢囊的生长越缓慢，最大生长量出现时间也越晚，不同稀释浓度下厚壁孢囊的最大生长点总是出现在塔玛亚历山大藻最大生长点之后的 2-4 天。

（3）不同培养基浓度下塔玛亚历山大藻和“游动孢子”的记数发现，塔玛亚历山大藻的最适生长培养基浓度为 100% 的 f/2 培养基，而“游动孢子”的最适生长培养基浓度则为 10% 的培养基浓度。强光刺激以及渗透压改变都会促使厚壁孢囊裂解，从而释放“游动孢子”。

(4) 使用改进后的低速离心收集未脱水的方法处理“游动孢子”样品，拍摄扫描电镜，对“游动孢子”的形态有个清晰的了解：细胞近似圆形，大小为 2-4 μm ；顶部具有两根不等长的鞭毛，长鞭毛是体长的 3-4 倍，具有茸毛，而短鞭毛是体长的 2/3 倍，没有茸毛；在鞭毛着生部位正对面有个底孔；底孔附近有个以凹陷起始的纵沟，一直延伸到鞭毛着生处。

(5) 提取“游动孢子”的基因组，进行 18s rDNA 序列扩增，测序，构建游动孢子的 SSU-rDNA 系统进化树。发现“游动孢子”与金藻门金藻纲色金藻目棕鞭藻科棕鞭藻属的两个种聚在一个分支上，支持率达到 95%。

(6) 对塔玛亚历山大藻进行记数观察，发现未经过处理的含菌和“游动孢子”的塔玛亚历山大藻相较于处理过的塔玛亚历山大藻会提前进入稳定期和衰亡期，而经过处理的无菌和“游动孢子”塔玛亚历山大藻的生长则更加稳定，不易衰老。

关键词：微流控芯片；塔玛亚历山大藻；“游动孢子”

Abstract

As a worldwide disaster, red tides may cause huge damage on marine environment, aquaculture and human health, so the origin and the control of red tides have always been the popular research for many experts and scholars. Miniaturized total analysis system (u-TAS) which was proposed in 1990s has many advantages including microminiaturization, integration, convenience and so on. So HAB algae's natural growth environment could be simulated on microfluidic chips, furthermore single cell or group cells also could be captured and controlled accurately. And this will provide a updated technology for studying the mechanism of red tide outbreaks and studying how to control the red tides.

This study focuses on the phenomenon that *Alexandrium tamarense* releasing swimming spores-like organisms ("zoospores" for short in this paper) with the support of microfluidic chip method. We recorded the life cycles of *A. tamarense* and the process about production, releasing, interaction and growth of swimming organisms through continuous culturing and observing on microfluidic chips, and we identified the swimming organisms which was released by *A. tamarense* using SEM and molecular biological methods. At the same time we analysed the SSU-rDNA phylogenetic tree of the swimming organisms, knew about the evolutionary process of swimming organisms and made a simple classification. We studied the ecological significance of parasitic swimming organisms.

Just as Denn et al., Garcés et al. and Leander et al. said in their papers, "zoospores" in this study are not the real zoospores which a part of *A. tamarense* life cycle, while they are the general terms of small and spherical-like swimming organisms released by *A. tamarense*.

(1) Fabricated a microfluidic chip which was used to culture *A. tamarense* and enrich "zoospores". Through the continuous recording of *A. tamarense* on microfluidic chip, we observed a phenomenon that many "zoospores" were discharged from *A. tamarense* cyst with thick wall. The number of "zoospores" which released by thick-walled cyst

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库